

⑤

Int. Cl. 2:

C 12 K 9-00

⑱ BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES



PATENTAMT

DT 24 31 450 A1

⑪

# Offenlegungsschrift 24 31 450

⑫

Aktenzeichen:

P 24 31 450.9-41

⑬

Anmeldetag:

1. 7. 74

⑭

Offenlegungstag:

23. 1. 75

⑳

Unionspriorität:

⑳ ㉑ ㉒

2. 7. 73 USA 376038

㉓

Bezeichnung:

Verfahren zur in vitro-Fortpflanzung und in vitro-Erhaltung von Zellen

㉔

Anmelder:

Monsanto Co., St. Louis, Mo. (V.St.A.)

㉕

Vertreter:

Berg, W.J., Dipl.-Chem. Dr.rer. nat.; Stapf, O., Dipl.-Ing.;  
Schwabe, H.-G., Dipl.-Ing.; Sandmair, K., Dipl.-Chem. Dr.jur. Dr.rer.nat.;  
Pat.-Anwälte, 8000 München

㉖

Erfinder:

Delente, Jacques Jean-Joseph, St. Louis, Mo. (V.St.A.)

DR. BERG DIPL.-ING. STAPF  
DIPL.-ING. SCHWABE DR. DR. SANI-MAJR  
PATENTANWÄLTE  
8 MÜNCHEN 86, POSTFACH 86 02 45

Dr. Berg Dipl.-Ing. Stapf und Partner, 8 München 86, P. O. Box 860245

2431450

Anwaltsakte Nr. 25 176

Ihr Zeichen  
Your ref.

Unser Zeichen  
Our ref. 25 176

8 MÜNCHEN 80  
Mauerkircherstraße 45

1. Juli 1974

MONSANTO COMPANY

St. Louis, Missouri 63166 /USA

---

Verfahren zur in vitro-Fortpflanzung und in vitro-Erhaltung von Zellen.

---

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro-Fortpflanzung und/oder in vitro-Erhaltung von Zellen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Fortpflanzung von Zellen auf der Oberfläche einer Hohlfasermembrane.

Die Kultivierung von in vitro-Wirbeltierzellen, d.h. die Kultivierung losgelöst vom Wirtstier, ist seit langem bekannt. Es wird im allgemeinen angenommen, daß die erste derartige Kultivierung in der ersten Dekade dieses Jahrhunderts durchgeführt wurde. Sie beinhaltete das Wachsen von infektiösen Kaninchen-Lymphoblasten.

Telegramme: BERGSTAPFPATENT München  
TELEX: 0524560 BERG d

Banken: Bayerische Vereinsbank München 453100  
Hypo-Bank München 3892623  
Postcheck München 65343-808

-2-

409884/1334

2431450

sarcom-Zellen im Blut.

Trotz langer Erfahrung hat diese Technik erst in den letzten Jahren Bedeutung gewonnen. Diese Bedeutung ist hauptsächlich bedingt durch den Bedarf an vielen Arten von Wirbeltierzellen für die humanmedizinische und tiermedizinische Forschung und Diagnose, durch die Kultivierung von infektiösen Materialien, wie Viren, und durch die Produktion von Hormonen und anderen biologischen Produkten. Gegenwärtig ist der Bedarf an Säugertierzellen besonders hoch, insbesondere an normalen Säugetierzellen, die zur Züchtung an einer Oberfläche gebunden werden müssen im Gegensatz zur Züchtung in einer Suspensionskultur.

Zahlreiche Prozeduren sind zur Fortpflanzung und/oder Erhaltung von gebundenen in vitro-Zellen entwickelt worden. Das vielleicht erfolgreichste aller dieser Verfahren beinhaltet das Binden und Züchten von Zellen an der inneren Oberfläche von Glas- und Kunststoffröhren und von Flaschen.

Ein anderes erfolgreiches Verfahren besteht darin, daß die Zellen auf der ebenen Fläche von zweckmäßig ausgebildeten feststehenden Flaschen gebunden und gezüchtet werden. Viele Arten von Zellen sind auf diese und andere Weise gezüchtet worden, wobei die Methoden am erfolgreichsten sind, bei denen abnormale oder veränderte Zellen erhalten werden, d.h. Zellen, die eine abnorme oder verschiedene Anzahl von Chromosomen gegenüber nor-

409884/1334

malen Zellen der gleichen Species besitzen und die die Fähigkeit haben, sich unbestimmbar oft zu regenerieren. Diese und andere bisherige Verfahren haben jedoch verschiedene ernsthafte Nachteile, insbesondere bei der Produktion von normalen, unveränderten Säugetierzellen im technischen Maßstab. Normale Zellen besitzen zum Unterschied zu abnormalen Zellen die normale Anzahl an Chromosomen und regenerieren sich vor der Alterung oder dem Tod nur in einer verhältnismäßig vorhersagbaren Anzahl von Fällen.

Der Hauptnachteil der bisherigen Verfahren bei der Fortpflanzung von normalen Säugetierzellen ergibt sich aus der Tatsache, daß es mit solchen Methoden schwierig ist, aerobe Bedingungen zu schaffen.

Anders ausgedrückt, wenn nicht genügend Sauerstoff an die normalen Zellen herangebracht wird, behalten die Zellen nicht ihre normale, differenzierte Funktion. Ein weiterer Nachteil der bisherigen Verfahren zur Fortpflanzung von gebundenen Zellen - ob normalen oder abnormalen - besteht darin, daß es schwierig ist, bindegewebeähnliche Dichten auf der Züchtungsoberfläche zu erreichen aufgrund der Probleme, die zu der Nährstoffdiffusion innerhalb des Bindegewebes gehören. Ferner lassen sich die bisherigen Verfahren nicht leicht in den technischen Maßstab übertragen und eignen sich daher nicht dazu, Zellen in großen Mengen wirtschaftlich zu produzieren. Von anderer Seite ist kürzlich eine Prozedur veröffentlicht worden, die Hohlfasern für die Zellen-

2431450

kultivierung verwendet (Science (1972) Seite 65 - 67). Die dort beschriebenen Bedingungen sind aber nicht solche, um aerobes Züchten zu erreichen. Die Veröffentlichung beschreibt die Verwendung eines Nährmediums als Sauerstoffträger. Bei der beschriebenen Fließgeschwindigkeit von 5 mm/Min. und einer Sauerstofflöslichkeit in einem solchen Medium, die mit 3 Mikrogramm/ml veranschlagt wird, ist die Sauerstoffversorgung für die erhaltene Zellenkultur von  $2,17 \times 10^8$  Zellen unzureichend. Das schaffen nur  $7 \times 10^{-15}$  g Sauerstoff/Min./Zelle. Der Sauerstoffbedarf der aeroben Zellen liegt im allgemeinen im Bereich von  $2,8 \times 10^{-14}$  bis  $2,6 \times 10^{-13}$  g Sauerstoff/Min./Zelle. Daher beschafft das beschriebene Verfahren nur etwa 1/4 bis 1/14 des Sauerstoffbedarfes der produzierten Zellen, abhängig von dem jeweiligen Sauerstoffbedarf der verwendeten Zellen. Obwohl hierdurch etwas aerobes Wachstum während der Anfangswachstumsstufen oder im Anfangskontaktteil des Reaktors erreicht werden könnte, so ist das in Wirklichkeit doch kein Zeichen für das Erreichen von aerobem Wachstum; denn es ist bereits lange bekannt gewesen, nach anderen Verfahren eine begrenzte Anzahl von Zellen unter aeroben Bedingungen zu kultivieren. Es ist nun mit der vorliegenden Erfindung gefunden worden, daß Zellen durch aseptisch gebundene Zellen an einer Wand einer Sauerstoff-durchlässigen Hohlfasermembrane und durch Inberührungbringen der entgegen-

409884/1334

setzten Wand der Hohlfasermembrane mit einem Sauerstoff-träg r fortgepflanzt werden, wobei der Sauerstoff veranlaßt wird, durch die Membrane zu dringen und ihn mit

den gebundenen Zellen unter aeroben Bedingungen in Berührung zu bringen, während gleichzeitig die gebundenen Zellen in einem Zellenkulturnährmedium gehalten werden. Indem Sauerstoff durch die Membrane von der Seite, die der entgegengesetzt ist, an der Zellen gebunden sind, durchgeht, ermöglicht das Verfahren der vorliegenden Erfindung eine kontinuierliche und gewünschtenfalls gleichmäßige Sauerstoffzufuhr, um die Zellen zu erreichen und zu versorgen, wobei aerobe Fortpflanzung der Zellen in der gewünschten Gewebedichte erleichtert wird. Der Sauerstoff für aerobes Wachstum wird zweckmäßig zugeführt, indem ein gasförmiger Träger verwendet wird, der in ausreichender Menge Sauerstoff enthält, um den Bedarf daran zu decken.

Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Zellen aseptisch an eine Wand oder (äußere oder innere) Oberfläche der Hohlfasermembrane gebunden, indem die Zellen, die in einem Zellenkulturmedium suspendiert sind, mit der gewünschten Membranwand in Berührung gebracht werden. Für die Zwecke des Bindens ist das "Zellenkulturmedium" typischerweise ein Nährmedium für die Zellen, jedoch kann auch ein Medium, das kein Nährmedium, aber physiologisch verträglich ist, wie physiologische Salzlösung, gewünschtenfalls verwendet werden. Nach dem Binden (und gewünschtenfalls während des Bindens) wird Sauerstoff den Zellen zugeführt, indem die entgegengesetzt Seite der Membrane mit einem Sauerstoffträger

7

in Berührung gebracht wird. Gleichzeitig werden die Zellen in einem Zellenkultur-Nährmedium inkubiert. Nach einer bevorzugten Ausführungsform werden die Zellen an die äußere Wand der Hohlfasermembrane gebunden, die vorzugsweise an beiden Enden offen ist. Hierdurch ist es möglich, kontinuierlich den Strom eines Sauerstoffträgers durch den Hohlkern der Faser zu leiten. Der kontinuierliche Durchgang des Sauerstoffträgers durch den Kern einer kontinuierlichen Hohlfaser kann durchgeführt werden, indem der Sauerstoffträger durch die Faser in gleichmäßigen Mengen geleitet wird oder indem der Sauerstoffträger durch die Faser pulsiert. Pulsieren wird bevorzugt, um eine optimale Verteilung des Sauerstoffs an allen Zellen zu erhalten und die Kanalisierung des Sauerstoffes zu vermindern. Alternativ kann die kontinuierliche Hohlfaser an einem Ende geschlossen sein. Bei dieser Prozedur wird der Sauerstoffträger in den Kern der Faser geleitet und Sauerstoff diffundiert durch die Wand und wird auf diese Weise mit den Zellen in Berührung gebracht. Eine Prozedur und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens wird im Fließdiagramm der Zeichnung veranschaulicht. Nach der Zeichnung besteht der Reaktor 1 aus einem Behälter 2, der viele Hohlfasern 3 enthält, die longitudinal in der Kammer angeordnet sind, mit oberen Enden 4, die in die Kammer 5, die sich oberhalb der Dichtung 9 befindet, hineinreichen. Das Nährmedium wird

aus dem Vorratsbehälter 10 durch Pumpe 11 zum Reaktor bei Einlaß 12 in den Behälter 2 außerhalb der Fasern gepumpt und kann aus dem Behälter durch Auslaß 13 entfernt werden und Pumpe 14 kann mit einer Fließgeschwindigkeit arbeiten, die niedriger ist als die der Pumpe 11, so daß weniger Medium durch den Auslaß 13 entfernt wird als durch den Einlaß 12 eintritt, was dazu führt, daß durch die Faserwand der Überschuß eindringt und durch die Hohlfaser fließt. Der Reaktor wird mit Sauerstoff versorgt, indem Luft vom Zylinder 16, der Luft und 3 % Kohlendioxyd enthält, durch Pumpe 17 und Leitung 18 zur Kammer 5 des Behälters 2 gepumpt wird, so daß die Luft an den offenen Enden 4 der Hohlfasern eintritt. Ein Pulsator 19 ist mit Leitung 18 verbunden. Der Pulsator 19 besteht aus einer Kammer 20, die ein Diaphragma 21 enthält, das die oberen und unteren Teile der Kammer voneinander trennt und Luftbewegung zwischen ihnen verhindert. Der obere Teil des Pulsators ist mit einem Ventil 22 verbunden, das so angeordnet sein kann, daß Zutritt zum Vakuum oder zu einer Luftdruckquelle geschaffen wird, und das durch ein Solenoid elektrisch mit einem Zähler 23 verbunden ist. Wenn das Ventil 22 zur Luftquelle hin geöffnet wird, wird das Diaphragma abwärts ausgedehnt, um im wesentlichen den unteren Teil der Kammer 20 zu füllen, um eine Luftquelle zu schaffen, die in die Kammer 5 eintritt und durch die Hohlfasern fließt. Die Kammer 20 und das Diaphragma 19 sind vor-

zugsweise so ausgelegt, daß ein ausreichendes Volumen in der Welle ist, um leicht das innere Gesamtvolumen der Hohlfasern in den Reaktoren zu überschreiten, so daß die Luftwelle im wesentlichen alle Materialien aus den Kernen der Fasern entfernen kann. Das Diaphragma kann aus Kautschuk oder anderem geeigneten Material hergestellt sein. Die Luft und das andere Material verläßt die Fasern durch ihre unteren Enden 7 und Kammer 8 über Leitung 24, um den Kessel 25 zum Überlaufen zu bringen. Da die Flüssigkeit in die Faser durch Diffusion oder weil mehr Flüssigkeit in den Reaktor gepumpt wurde als durch den Ausschluß 13 entfernt wurde, eingedrungen sein kann, wird Flüssigkeit im allgemeinen entfernt und über Leitung 24 geschickt, um Kessel 25 zum Überlaufen zu bringen. Leitung 24 ist auch durch das Ventil 26 mit dem Zylinder 16 verbunden, aber hiermit wird nur der Zweck verfolgt, den Zylinder als Sauerstoffquelle zur Kalibrierung zu verwenden, und Ventil 26 ist normalerweise geschlossen. Der Überlaufkessel 25 ist mit einem Vorratsbehälter 27 verbunden und mit Instrumenten 28 und 29 versehen, um pH- und Sauerstoffmessungen an den Instrumenten 30 und 31 vorzunehmen. Der Reaktor ist mit Mitteln zur Temperaturkontrolle durch Kontrolleinrichtung 32 verbunden. Der Kühler 33 schafft Kühlung für die Komponenten 10, 15 und 27. Die beschriebene Vorrichtung kann beispielsweise mit einer 5 ml/Min. Luftfließgeschwindigkeit arbeiten und mit einem Einlaß von flüssigem Medium von 0,4 ml/Min.

und ein m Auslaß durch Auslaß 13 von 0,1 ml/Min. Diese verlassen 0,3 ml/Min. flüssiges Medium, um in die Fasern einzudringen, und 5 ml/Min. Gase gehen ab. Außer durch die Dichtungen 6 und 9 werden die Fasern gegeneinander in der Nähe ihrer Enden durch eine harzartige Verbindung verschlossen, um Materialbewegung aus den Zwischenräumen der Fasern in die Kammern 5 und 8 zu verhindern. Die Teile der Vorrichtung können natürlich in ihrer Größe schwanken. Ein Reaktor von einer Gesamtlänge von 25 cm mit einer Faserlänge von etwa 20 cm kann jedoch verwendet werden, wobei etwa 15 cm der Faser für Zellenwachstum zur Verfügung stehen. Ein derartiger Reaktor kann einen Gesamtdurchmesser von etwa 5 cm haben mit einem Behälter 2, der einen Außendurchmesser von 2,38 cm und einen inneren Durchmesser von 1,9 cm aufweist. Der Behälter kann etwa 1000 Fasern von 360 Mikrometer Außendurchmesser und 200 Mikrometer Innendurchmesser für ein wirksames Hohlkern-Gesamtvolumen von etwa 6,3 ml enthalten. Der Pulsator 19 hat ein Innenvolumen von etwa 28 ml und das Diaphragma kann etwa 8 ml des unteren Teiles der Kammer verdrängen, so daß die Welle geeignet ist, um die Fasern leer zu fegen. Die Welle ergibt einen Differentialdruck von 0,21 - 0,35 kg/cm<sup>2</sup>. Der Puls kann bei verschiedenen Frequenzen arbeiten, beispielsweise in einem Zyklus von 10 Sek. bei Vakuum und von 10 Sek. bei Luftdruck mit Wiederholung des Zyklus. Der Zyklus kann gewünschtenfalls variiert werden unter Verwendung einer verschiedenen Dauer für die Luftdruck-

ΛΛ

und Vakuumphasen des Pulsators und der Pulsator kann auch arbeiten, um irreguläre Luftwellen eher als reguläre Zyklen zu schaffen. Die Welle kann auch verschiedene Formen aufweisen, beispielsweise einen kurzen starken Anstieg beim Druck, an dem sich ein langsamer Abfall anschließt, oder einen regulären gemäßigten Anstieg mit gemäßigtem Abfall usw. ohne Wellencharakteristiken usw.. Es ist nicht erforderlich, einen Flußabfall auf 0 zwischen den Wellen zu haben, obwohl das zu akzeptablen Ergebnissen führt. Tatsächlich kann der Fluß sogar gewünschtenfalls bei einigen Stufen der Pulsierung umgekehrt sein. Der Reaktor kann bei verschiedenen Geschwindigkeiten usw. arbeiten, aber beispielhafte Geschwindigkeiten sind 5 ml/Min. Luftfluß und 0,4 ml/Min. Flüssigkeitseinlaß und 0,3 ml Flüssigkeit, die in die Fasern eindringt und an deren Enden abgeht.

Beim Verfahren der vorliegenden Erfindung kann ein beliebiger geeigneter Sauerstoffträger verwendet werden. Im allgemeinen ist Luft der bevorzugte Sauerstoffträger, jedoch können auch Träger, die gelösten Sauerstoff, wie Silikonpolymerisate, Hämoglobin, Fluorkohlenwasserstoffe und mit Sauerstoff beladenes Nährmedium mit den gewünschten Resultaten verwendet werden, obgleich spezielle Prozeduren oder Bedingungen dann erforderlich sein können, um den Sauerstoffbedarf zu befriedigen, um aerobes Wachstum zu erhalten. Wenn Luft oder andere geeig-

te Gasgemische von Stickstoff und Sauerstoff verwendet werden, ist auch bevorzugt, daß das Gas kleine Mengen an Kohlendioxyd, beispielsweise in der Größenordnung von 2 - 5 % enthält. Das Kohlendioxyd dient dazu, um einen Carbonatpuffer zu schaffen und trägt damit zur Aufrechterhaltung des pH des Mediums auf der anderen Seite der Membrane im gewünschten Bereich bei.

Die Zellen werden in einem Zellkulturnährmedium unter Zellwachstums-Erhaltungs-Bedingungen von pH und Temperatur inkubiert. Geeignete Zellkulturnährmedien sind bekannt und solche können bei dem Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Solche Kulturnährmedien enthalten typischerweise die bekannten essentiellen Aminosäuren, Vitamine, Kohlenhydrate, Mineralsäuren und vorzugsweise Blutserum. Fungizide und Bakterizide können auch in gewünschten Mengen in solchen Medien eingeschlossen sein, um das Wachstum von unerwünschten Mikroorganismen zu verhindern. Wie oben angegeben, wird der pH des Nährmediums vorteilhaft innerhalb des gewünschten Bereiches (typischerweise von 6,8 - 8,2) kontrolliert, indem geringe Mengen von Kohlendioxyd im Sauerstoffträger enthalten sind.

Gewünschtenfalls kann aber der pH kontrolliert werden, indem ein geeigneter Puffer, wie "HEPES"-Puffer (ein Gemisch von N-2-Hydroxyäthyl-piperazin und N'-2-Äthansulfonsäure) im Zellkulturnährmedium selbst enthalten ist. Andere geeignete Methoden zur Kontrolle des pH, wie

Durchgehen des Mediums durch Ionenaustauscherharze können auch angewandt werden.

Die Wahl der Temperatur für die Inkubierung der Zelle bleibt dem Fachmann auf dem Gebiet der Zellen- und Bindegewebekultivierung überlassen und hängt grundsätzlich von der physiologischen Temperatur der jeweiligen Zellen ab, die fortzupflanzen sind, das ist die optimale Temperatur, bei der Wachstum oder Erhaltung der Zellen stattfindet. Wenn beispielsweise normale Säugerzellen fortgepflanzt werden, wird typischerweise ein enger Temperaturbereich von etwa 35 - 40°C verwendet, während beispielsweise ursprünglich niedrigere oder höhere Temperaturen verwendet werden können, falls die Zellen Reptilienzellen sind.

Das Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet Hohlfasermembrane. Die Hohlfasermembrane können in beliebiger Form verwendet werden, wie beispielsweise als Bündel, in einzelnen Strängen oder in Maschenform. Die Hohlfaser muß natürlich gasdurchlässig sein, aber undurchlässig für Zellen. Die Membrane kann eine dichte Struktur haben oder eine "Loeb"-Struktur. Die Hohlfaser kann aus einem beliebigen geeigneten Material hergestellt werden, das nicht für die Zellen toxisch ist, das in geeigneter Weise zu Fasern versponnen werden kann und das ermöglicht, daß sich Zellen daran binden. Beispiele derartiger Materialien sind Polyolefine, wie Polyacrylnitril und Polystyrol, polyionische Polym risa-

t , Polykohlenhydrate, wie Cellulose und Cellulosederivate, beispielsweise Celluloseester, Polypeptide, wie Collagen, Silikonkautschukpolymerisate, Fluorkohlenwasserstoffpolymerisate usw. Es ist gefunden worden, daß Zellbildung an der Oberfläche der Membrane gefördert wird, wenn die Membrane eine erhöhte Oberflächenenergie besitzt, wie es durch die Anwesenheit von positiven oder negativen Ladungen evident wird. Das Binden von Zellen an eine andere geeignete Membrane kann gefördert werden, indem die Oberfläche, an die die Zellen gebunden werden sollen, mit Collagen überzogen wird.

Die optimalen Dimensionen für die Hohlfasern können schwanken und sind unter anderem von der Vorrichtung und von dem verwendeten Sauerstoffträger abhängig. Im allgemeinen liegt der Innendurchmesser der Hohlfaser im Bereich von etwa 10 - 300 Mikron, vorzugsweise im Bereich von 50 - 100 Mikron. Die Membranwand muß natürlich ausreichend dünn sein, um den gewünschten Durchgang zu ermöglichen und ausreichend dick sein, um nicht unter den angewandten Bedingungen zu zerbrechen. Geeignete Membrane haben typischerweise eine effektive Wandstärke von etwa 10 bis 100 Mikron.

Geeignete Zellen zur Fortpflanzung gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Bindegewebszellen von Wirbeltieren, die imstande sind, sich an einer Oberfläche zu binden, zu wachsen oder zu erhalten. Natürlich können Zellen, die nicht zur Proliferation fähig sind,

wie Erythrocyten, beim erfindungsgemäßen Verfahren nicht verwendet werden. Beispiele von geeigneten Zellen sind diploide Zellquerschnitte, wie WI-38 menschliche Lungenfibroblaste, MRC-5 männliche menschliche Lungenfötus-Fibroblaste und DBS-FRh L-2 Rhesusaffen-Lungenfötus-Fibroblaste; primäre Zellen, wie Rinder- und menschliche Vorderhypophysenzellen, Hühnerembryo, Froschepithelzellen und Rattenleberzellen, gebildete Zellquerschnitte, wie "Hela"-menschliche Cervix (Carzinom) Zellen, Rhesusaffennierenzellen (LLC-MK<sub>2</sub>), Baby-Nierenzellen vom syrischen Hamster (BHK-21) usw..

Es ist davon auszugehen, daß die obige Aufstellung von Zellen nur zur Veranschaulichung dient und daß andere Zellen aus anderen Quellen, einschließlich Vögel, Säugtiere, Reptilien und Amphibien einschließlich normale und abnormale Zellen nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung fortgepflanzt und erhalten werden können.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

In den Beispielen wurde die Herstellung der Zellen, die Herstellung des Inoculums und die Zellkultivierungsversuche unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### Beispiel 1

##### Herstellung der Zellen

Eine Kalbshypophyse, die durch Sektion eines frisch geschlachteten Tieres erhalten wurde, wurde annähernd 4 Stunden in einem Phosphat-gepufferten Salzmedium (PBS)

gelagert, das folgende Zusammensetzung hatte:

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Penicillin	100 000 Internationale Einheiten
Streptomycin	0,1 g

destilliertes Wasser 900 ml

Die Temperatur des Mediums während der Lagerung betrug etwa 25°C. Das Vorderteil wurde von der Drüse seziiert, gereinigt, um das Bindegewebe zu entfernen, und zerstückelt. Die zerstückelte Vorderdrüse wurde vorsichtig mit einer wässrigen Lösung von Trypsin in einer Petri-Schale gemischt und das erhaltene Gemisch wurde 18 Stunden bei Zimmertemperatur unter sterilen Bedingungen stehengelassen, um die Freigabe von einzelnen Zellen an die Flüssigkeit zu erreichen. Die wässrige Trypsinlösung wurde hergestellt, indem 10 ml PGS mit 250 000 Einheiten von getrocknetem, pulverförmigem Trypsinenzym, das unter der Bezeichnung "Tryptar" von der Fa. Armour und Co., Chicago, Illinois geliefert wird, und 0,75 ml 0,5 n Natronlauge gemischt werden. Die freigegebenen Hypophysezellen (Epithelzellen) wurden von dem übrigen Bindegewebe durch wiederholtes Zentrifugieren, Filtrieren und Waschen abgetrennt. Es wurde durch Zellenzählen

17

(mit Hilfe eines Häemocytometers) festgestellt, daß die erhaltene gewaschene Zellensuspension  $1,37 \times 10^6$  Zellen pro ml enthielt.

# Herstellung des Inoculums

Um das Inoculum herzustellen, wurden 30 ml der gewaschenen Zellensuspension auf 100 ml mit "Eagle's"-Basalmedium (EBM), das 10 % Kalbfötusserum enthielt, verdünnt. Die Zusammensetzung von 90 % "Eagle's"-Basalmedium (EBM<sub>90</sub>) und 10 % Kalbfötus (Kalbfötus<sub>10</sub>) war folgende:

	mg/l
l-Argininchlorhydrat	105
l-Cystin	24
l-Histidinmonohydrochlorhydrat	31
l-Isoleucin	52
l-Lysinchlorhydrat	58
l-Leucin	52
l-Methiomin	15
l-Phenylalanin	32
l-Threonin	48
l-Tryptophan	10
l-Tyrosin	36
l-Valin	46
Cholinchlorid	1,00
Folinsäure	1,00
Isoinositol	1,00
Nicotinamid	1,00
Pantothensäure	1,00

	mg/l
Pyridoxal	1,00
Thiamin	1,00
Riboflavin	0,10
NaCl	6800
KCl	400
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	150
$\text{NaHCO}_3$	2000
$\text{CaCl}_2$	200
$\text{MgCl}_2$	200
Glukose	1000
l-Glutamin	212
Phenolharnstoff	20
Streptomycin	50
Penicillin	50 000 Internationale Einheiten

### Reaktor

Die Kultivierung der Zellen wurde unter Verwendung eines Zellenkulturreaktors, der aus einem Bündel von 100 U-förmigen Polymerisat-Hohlfasern mit offenen Enden bestand, in einem 10 ml Glaskolben durchgeführt. Die beiden Enden der Faserbündel sind in separate Löcher eines 3-löchigen Kautschukhalters eingepaßt, wobei der Halter am Kolbenhals gelegen ist. Das dritte Loch des Halters ist für die Einleitung und Extraktion des Mediums vorgesehen. Das Hohlfasermaterial ist ein handelsübliches polyionisches Polymerisatmaterial, das unter der Be-

zeichnung "Amicon X M-50" von der Fa. Amicon Corp., Lexington, Massachusetts geliefert wird. Jede Faser ist 10 cm lang und hat etwa  $1/2 \text{ cm}^2$  Zellenwachstums-oberfläche. Jede Faser hat einen Innendurchmesser von 360 Mikron und eine Wandstärke von 80 Mikron, wobei die Wand eine "Loeb"-Ausbildung hat.

#### Zellenkultivierung

Der Reaktor wurde unter Verwendung von  $\beta$ -Propionlacton-Dämpfen sterilisiert und anschließend mit Phosphatpuffer gespült. 8 ml oben hergestelltes Inoculum wurde in den Reaktor eingeleitet, um Zellen an die Außenwände der Fasern zu binden. Der Reaktor wurde in einen ummantelten Kohlendioxyd-Inkubator gestellt und der Inhalt wurde bei  $37^\circ\text{C}$  49 Tage inkubiert. Während der 49-tägigen Inkubationszeit wurde ein gefiltertes Luftgemisch mit 3 % Kohlendioxyd durch das Innere der Hohlfasern (mit einer Luftpumpe) gepumpt. Während der Inkubation wurde das Medium in 2-tägigen Intervallen gewechselt. Das abgezogene Medium wurde gesammelt und für die Analyse zurückbehalten. Nach Vervollständigung der Inkubationszeit wurde das Medium aus dem Reaktor abgezogen und ein starkes zusammenfließendes Wachstum der Zellen wurde auf den Hohlfasern beobachtet. Die Zellen wurden anschließend für die mikroskopische Untersuchung durch Formaldehydfixierung und Aufbringen auf die Fasern präpariert. Es wurde durch mikroskopische Untersuchung festgestellt, daß die Zellen normal waren. Die zurückbehal-

tenen Medien wurden auf Milchsäure und Wachstumshormon analysiert. Die Analyse zeigte, daß die zurückbehaltenen Gesamtmedien 700 Nanogramm Wachstumshormon enthielten und daß die Medien im wesentlichen frei von Milchsäure waren. Die wesentliche Abwesenheit von Milchsäure zeigt an, daß das Zellwachstum unter aeroben Bedingungen erreicht wurde.

Zur Kontrolle wurden 10 ml des oben hergestellten Zellen-Inoculum-Mediums in jeweils 2 "T"-Kolben gestellt und das Medium wurde in dem ummantelten Kohlendioxyd-Reaktor 49 Tage bei 37°C inkubiert (gleichzeitig mit dem Zellenkulturreaktor). Das Medium wurde in 2-tägigen Intervallen gewechselt und das abgezogene Medium wurde gesammelt und zurückgehalten. Der Wachstumsbereich für jeden "T"-Kolben betrug 50 cm<sup>2</sup>. Die zurückbehaltenen Medien wurden auf Wachstumshormon und Milchsäure untersucht. Die Analyse zeigte, daß die kombinierten Medien aus beiden Kolben 800 Nanogramm Wachstumshormon enthielten, (im Mittel 400 Nanogramm pro Kolben) und dass die Produktion von Milchsäure (bezogen auf Glukose) quantitativ war. Die quantitative Produktion von Milchsäure zeigte anerobe Zellenwachstumsbedingungen.

#### Beispiel 2

In diesem Beispiel ist der verwendete Zellenkulturreaktor von der in der US-Patentschrift 3 228 877 beschriebenen Art. Der Reaktor besteht aus einem Bündel von 1000

kontinuierlichen Hohlfasern (Amicon XM-50) mit einer Gesamtaußenoberfläche von etwa  $900 \text{ cm}^2$ , die in einem röhrenförmigen Gehäuse enthalten sind. Die Hohlfasern sind an jedem Ende offen, um einen kontinuierlichen Fluß des Sauerstoffträgers zu ermöglichen. Ein Zellen-inoculum-Medium von Schweine-Hypophysezellen ( $7,6 \times 10^5$  Zellen pro ml) wurde analog Beispiel 1 hergestellt. Der Zellenkulturreaktor wurde mit 33 ml Inoculummedium inoculiert, um Zellen an die äußere Oberfläche der Fasern zu binden. Die Inkubation wurde 6 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt, um ein zusammenfließendes Wachstum der Zellen unter aeroben Bedingungen auf der Faser herbeizuführen. Während der 6-tägigen Periode wurde Luft mit 3 % Kohlendioxyd durch die Fasern pulsartig mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/Min. (1 Puls alle 10 Sek.) geleitet. Während der 6-tägigen Periode wurde das Zellenkulturmedium kontinuierlich beschickt. Nach anfänglicher Einleitung des Inoculums wurde der Mediumwechsel durch kontinuierliches Pumpen von Medium ( $\text{EBM}_{99}$  Kalbfötus<sub>1</sub>) in den Reaktor in Kontakt mit den äußeren Wänden der Fasern mit der Geschwindigkeit von 4 ml/Min. und aus dem Reaktor (mit Ausnahme des Mediums, das durch die Fasern abgeleitet wurde) mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/Min. herbeigeführt. Durch diese Prozedur fließt das Medium radial durch die Zellschichten, durch die Wände der Fasern und in die Hohlkerne der Fasern. Das abgeführte Medium wurde untersucht und gefunden, daß es

Wachstumhormon enthielt.

Das radiale Fließen des Mediums bei der Prozedur dieses Beispiels sorgt für eine optimale Verteilung der Nährstoffe und hilft bei der Bildung von dichten Zellschichten. Da bei radialem Fließen die kleineren Moleküle die Hohlfasermembrane leichter durchdringen als größere Moleküle, dient die Prozedur ferner dazu, große Moleküle (Kalbfötusserum, Hormone und andere Metabolite) auf der anderen Seite der Membrane zu konzentrieren.

### Beispiel 3

Die allgemeine Prozedur des Beispiels 2 wurde mit der Ausnahme wiederholt, daß der Sauerstoffträger Sauerstoffenthaltendes "Eagle's"-Basalmedium ohne Serum war, das durch das Innere der Hohlfasern mit einer Geschwindigkeit von 12 ml/Min. gepumpt wurde. Die Inkubation wurde 12 Tage durchgeführt. Starkes zusammenfließendes Zellenwachstum wurde auf den Fasern beobachtet. Zellenwachstum war während der ersten vier Tage aerob und danach anaerob.

### Beispiel 4

Menschliche Embryo-Lungenfibroblaste (WI-38-Zellen in der 26. Generation, isoliert von L. Hayflick) wurden nach der folgenden allgemeinen Prozedur der Beispiele 2 und 3 24 Tage bei 37°C in einem Zellenkulturreaktor, der aus einem Bündel von polymeren Hohlfasern (Amicon XM-50

Polymerisat) in einem rechtwinkligen Gehäuse bestand. Die Fasern waren an jedem Ende offen, um einen kontinuierlichen Fluß des Sauerstoffträgers zu ermöglichen. Der pH des Zellenkulturmediums fluktuierte während der 24-tägigen Inkubationszeit im Bereich von etwa 7,2 bis 7,9. Das Hohlfaserbündel hatte eine äußere Gesamtoberfläche von etwa  $85 \text{ cm}^2$ , von denen etwa  $65 \text{ cm}^2$  der Oberfläche kontinuierlich während der 24-tägigen Inkubationszeit im Medium eingetaucht waren. Die Zellen wurden an die äußeren Wände der Fasern wie in Beispiel 2 mit annähernd 58 % der an die Außenwände der Fasern zu bindenden Zellen nach 18 Stunden gebunden. Die Zelldichte an den Fasern betrug nach 18 Stunden  $1,56 \times 10^4 / \text{cm}^2$  Oberfläche. Nach Vervollständigung der 18-stündigen Bindungszeit wurde das Medium in und durch den Reaktor in Kontakt mit den Außenwänden der Fasern bei einer Geschwindigkeit von 4 ml/Stunde gepumpt und der Sauerstoffträger (Luft + 3 %  $\text{CO}_2$ ) wurde durch die Fasern mit einer Geschwindigkeit von 50 ml/Stunde geleitet. Um optimalen Kontakt des Mediums mit den Zellen zu erreichen, wurden die Fasern in dem Bündel in einer ausgebreiteten Lage beibehalten und das Medium wurde in den Reaktor senkrecht zu den Fasern gepumpt. Zusammenfließen- des Wachstum der Zellen an den Fasern wurde nach 10-tägiger Inkubation mit einer zu beobachteten Zelldichte von  $1 - 1,5 \times 10^5$  erhalten. Nach der 14-tägigen Inkubation betrug die Zelldichte  $7,5 \times 10^5$  Zellen/ $\text{cm}^2$ . Di

Zellen wurden weitere 10 Tage ohne Zunahme in der Zelldichte, die nach 14-tägiger Inkubation erhalten wurde. Nach 24-tägiger Inkubationszeit wurden die Zellen von den Fasern durch Trypsinierung entfernt. Die Zellen hatten bei der mikroskopischen Untersuchung ein normales Aussehen.

Es ist sehr vorteilhaft, das vorliegende Verfahren unter Bedingungen durchzuführen, die passenden Sauerstoff für Zellenerhaltung oder Zellenwachstum unter aeroben Bedingungen gewährleisten. Durch Verwendung von Luft oder anderen Gasen in der Faser ist es möglich, Sauerstoff mit einer viel größeren Geschwindigkeit zu liefern (beispielsweise weist Luft 0,0029 g Sauerstoff/ml auf), verglichen mit viel niedrigeren Sauerstofflöslichkeiten in den meisten Flüssigkeiten. Auch die Diffusionsgeschwindigkeiten ist in Gasen schnell, aber viel langsamer in Flüssigkeiten. Luft ist etwa 4000 mal so wirksam bei der Beschaffung von Sauerstoff als es ein mit Sauerstoff gesättigtes wässriges System ist. Andere gasförmige Systeme, die Sauerstoff enthalten, werden zweckmäßigerweise verwendet und jedes beliebige System mit einer Partialgasphase, wie ein Schaum, wird als gasförmiges System betrachtet. Die Sauerstoffmenge, die im Sauerstoffträger benötigt wird, schwankt mit der Fließgeschwindigkeit und anderen Faktoren, aber Sauerstoffkonzentrationen, die größer als 50 - 100 Mikrogramm pro ml sind, sind allgemein geeignet. Die praktischen

Fließgeschwindigkeiten werden an der oberen Seite durch die Festigkeit der Fasern begrenzt und die Verwendung von hohen Sauerstoffkonzentrationen vermindert den Bedarf an hohen Fließgeschwindigkeiten. Ein gasförmiges System kann verschiedene andere Gase als Verdünnungsmittel zusammen mit Sauerstoff verwenden.

Allgemein ist es wünschenswert, daß derartige Verdünnungsmittel relativ inert sind oder mindestens nicht als solche bekannt sind, die einen starken schädlichen Einfluß auf die Zellkulturen haben und daß derartige Verdünnungsmittel nicht leicht mit Sauerstoff reagieren, um den zur Verfügung stehenden Sauerstoff aufzubrauchen. Das vorliegende Verfahren kann atmosphärische, unteratmosphärische oder überatmosphärische Drucke verwenden und falls es aus einem bestimmten Grund wünschenswert ist, bei unteratmosphärischen Drucken zu arbeiten, kann Sauerstoff bei etwa 0,2 Atmosphären verwendet werden und es ist dann nicht notwendig, irgendein Verdünnungsmittel anstelle von Sauerstoff zu verwenden. Das vorliegende Verfahren verwendet nicht allgemein Sauerstoff in derartig hohen Konzentrationen, daß der Tod einer erheblichen Anzahl von Zellen herbeigeführt wird. Bei der Produktion von Zellen ist es wünschenswert, hohe Produktions- und Wachstumsgeschwindigkeiten zu erreichen und das unter aeroben Bedingungen zu erreichen. Beim vorliegenden Verfahren ist es daher wünschenswert, Sauerstoff zu liefern, der den Maximalbedarf

daran überschreitet, um aerobes Wachstum oder aerobe Erhaltung bei der maximalen Zellenproduktionsgeschwindigkeit und mit der maximalen Zellendichte, die schließlich erreicht wird, zu schaffen und daß bei der Langzeitkultivierung. Natürlich werden einige der Vorteile des Verfahrens definitiv erreicht, wenn das Zellenwachstum unter aeroben Bedingungen mit mehr als der passenden Sauerstoffmenge für eine akzeptable Zeit stattfindet, sogar dann, wenn schließlich etwas anaerobes Wachstum wegen der Produktion von vielen Zellschichten stattfindet, die die Sauerstoffdiffusion behindern. Es ist daher eines der Kennzeichen der vorliegenden Erfindung, passenden Sauerstoff für aerobes Wachstum bei einer maximalen oder hohen Zellendichte zu schaffen, wenn auch ein solches Wachstum unter einigen Bedingungen nicht erreicht werden kann. Der Sauerstoff kann zweckmäßig in einer Konzentration geliefert werden, die ausreicht, um den Bedarf daran zu überschreiten.

P a t e n t a n s p r ü c h e

①. Verfahren zur in vitro-Fortpflanzung oder in vitro-Erhaltung von Zellen, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t, daß

a) eine Suspension von Zellen in einem Zellenkulturmedium mit einer Wand einer nicht-toxischen Sauerstoff-durchlässigen Hohlfasermembrane in Berührung gebracht wird, wobei die Zellen an diese Wand der Hohlfasermembrane gebunden werden,

b) die gegenüberliegende Wand der Membrane mit intermittierenden Stößen eines gasförmigen Sauerstoffträgers in Berührung gebracht wird, wobei der Durchgang des Sauerstoffes durch die Membrane bewirkt und der Sauerstoff mit den an der anderen Seite der Membrane gebundenen Zellen in Berührung gebracht wird und gleichzeitig die Zellen in einem Zellenkulturmedium unter Zellenvachstums- oder Zellenerhaltungs-Bedingungen von pH und Temperatur inkubiert werden und der Sauerstoff in einer solchen Konzentration zugeführt wird, die ausreicht, um den maximalen Sauerstoffbedarf zu überschreiten und um aerobe Bedingungen zu schaffen.

2. Verfahren zur in vitro-Fortpflanzung und in vitro-Erhaltung von Zellen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß

a) eine Suspension von Zellen in einem Zellenkulturmedium

geschaffen wird,

b) die Suspension mit der äußeren Wand einer nicht-toxischen, Sauerstoff-durchlässigen, kontinuierlichen Hohlfasermembrane, die offene Enden hat, in Berührung gebracht wird, wobei diese offenen Enden für die Suspension unzugänglich sind und wobei die Zellen an dieser äußeren Wand der Hohlfasermembrane gebunden werden, und  
c) Luft mit pulsierendem Fluß durch das Innere dieser Hohlfasermembrane geleitet wird, wobei die Durchlässigkeit des Sauerstoffes durch die Fasermembrane bewirkt wird und der Sauerstoff mit den gebundenen Zellen in Berührung gebracht wird und gleichzeitig die Zellen in einem Zellenkultur-Nährmedium unter Zellenwachstums- oder Zellenerhaltungsbedingungen von pH und Temperatur inkubiert und der Sauerstoff in einer solchen Konzentration zugeführt wird, die ausreicht, um den maximalen Sauerstoffbedarf zu decken und um aerobe Bedingungen zu schaffen.

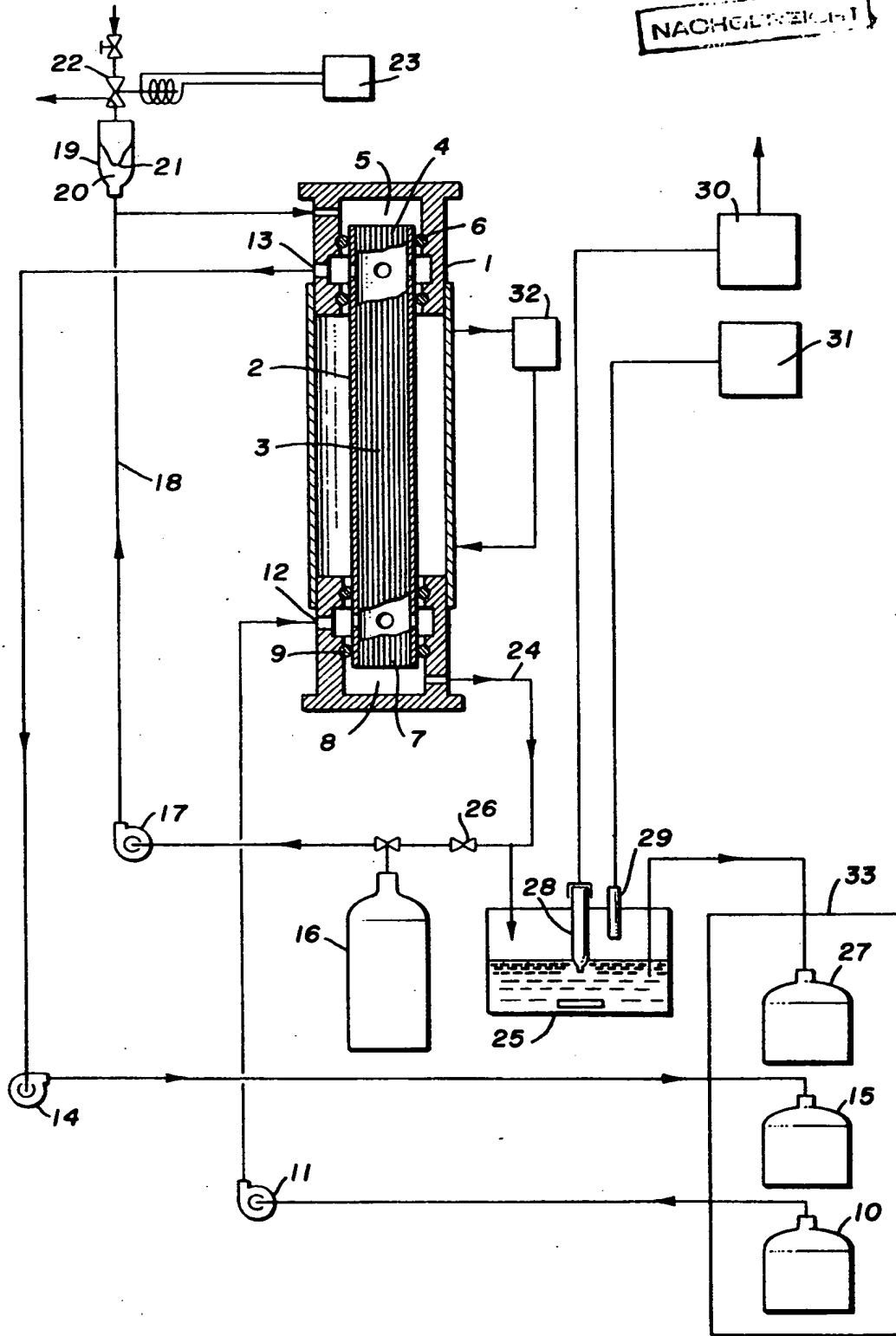
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, d a d u r c h g e -  
k e n n z e i c h n e t, daß die Zellen normale Säuge-  
tierzellen sind.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, d a d u r c h g e -  
k e n n z e i c h n e t, daß die Zellen menschliche  
Zellen sind.

5. Verfahren gemäß Anspruch 3, d a d u r c h g e -  
k e n n z e i c h n e t, daß die normalen Säugetier-  
zellen pituitäre Zellen sind.

6. Verfahren gemäß Anspruch 2, d a d u r c h g e -  
k e n n z e i c h n e t, daß das Nährmedium außerhalb  
der Fasern in einer Weise vorgesehen ist, daß das Me-  
dium durch die Faserwände fließt und in die Hohlkerne.

NACHGEZEIGT



409884/1334

C12K 9-00 AT: 01.07.74 OT:23.01.75

**30**  
Leerseite

Y